

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

**(54) PRODUCTION OF OPTICALLY ACTIVE (R)-4-PHENYL-2-BUTANOL**

(11) 63-12288 (A) (43) 19.1.1988 (19) JP  
 (21) Appl. No. 61-157090 (22) 3.7.1986  
 (71) KANEGAFUCHI CHEM IND CO LTD (72) JUNZO HASEGAWA(3)  
 (51) Int. Cl<sup>4</sup>. C12P7/22/(C12P7/22,C12R1:72)(C12P7/22,C12R1:84)(C12P7/22,C12R1:88)(C12P7/22,C12R1:645)

**PURPOSE:** To obtain the titled compound useful as a synthetic raw material for pharmaceuticals, agricultural chemicals, perfumes, etc., in high efficiency, by microbial asymmetric reduction of 4-phenyl-2-butanone using a microbial strain belonging to *Candida* genus, *Geotrichum* genus, etc.

**CONSTITUTION:** 4-Phenyl-2-butanone is brought into contact with a microbial strain selected from microorganisms belonging to *Candida* genus, *Geotrichum* genus, *Nadsonia* genus, *Pichia* genus, *Saccharomycopsis* genus, *Stephanoascus* genus or *Torulopsis* genus and the produced objective compound is separated from the reaction system. The reaction is carried out by adding 4-phenyl-2-butanone to the cultured liquid of said microorganisms or to a suspension produced by separating the microbial cells from the cultured liquid and dispersing in a phosphoric acid buffer solution, etc., and reacting at 5~9pH and 10~60°C for 1~120hr under agitation, preferably in the presence of a carbon source such as glucose, sucrose, etc., as an energy source.

**(54) PRODUCTION OF  $\gamma$ -LINOLENIC ACID GLYCERIDE**

(11) 63-12289 (A) (43) 19.1.1988 (19) JP  
 (21) Appl. No. 61-154103 (22) 2.7.1986  
 (71) NIPPON OIL & FATS CO LTD (72) KOICHI MAEDA(2)  
 (51) Int. Cl<sup>4</sup>. C12P7/62

**PURPOSE:** To obtain the titled substance utilizable as pharmaceuticals, etc., in high efficiency, by partially hydrolyzing an oil or fat containing GLA as a constituent fatty acid with an oil or fat hydrolase and removing free fatty acid from the product.

**CONSTITUTION:** An oil or fat containing GLA ( $\gamma$ -linolenic acid), e.g. seed oil such as RURI-JISHA seed oil, oil of algae belonging to *Spirulina* genus, etc., or oil of microorganism belonging to *Cunninghamella* genus is hydrolyzed by using preferably 50~500IU of a lipase originated from microorganism, animal or vegetable based on 1g of the oil or fat. The decomposition is usually carried out by mixing a GLA-containing oil or fat with an aqueous solution of lipase and hydrolyzing in emulsified state. The amount of water is preferably 1~50pts. wt. per 1pt. of the oil or fat and the degree of hydrolysis is preferably 40~85%. The titled substance can be separated from free fatty acid e.g. by removing the acid with an alkali.

**(54) PRODUCTION OF LIPID CONTAINING ARACHIDONIC ACID**

(11) 63-12290 (A) (43) 19.1.1988 (19) JP  
 (21) Appl. No. 61-212168 (22) 9.9.1986 (33) JP (31) 85p.218558 (32) 1.10.1985(01)  
 (71) LION CORP (72) EISEI TOTANI(2)  
 (51) Int. Cl<sup>4</sup>. C12P7/64/(C12P7/64,C12R1:645)

**PURPOSE:** To obtain a lipid rich in arachidonic acid useful as a precursor of prostaglandin, thromboxane, etc., by culturing a specific microbial strain belonging to *Mortierella* genus.

**CONSTITUTION:** A microbial strain belonging to *Mortierella* genus and selected from *Mortierella alpina*, *bainieri*, *elongata*, *exigua*, *minutissima*, *verticillata*, *hygrophila* and *polycephala* is cultured in a solid-liquid medium by standing culture, shaking culture, aeration and agitation culture, etc. The microbial cells are separated from the cultured product, disintegrated by mechanical or physical means and extracted with a solvent, supercritical carbon dioxide, etc., to obtain a lipid rich in arachidonic acid. The culture is preferably carried out at an initial pH of 4.0~7.0 at 10~33°C, especially 20~30°C for 2~20 days.

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-12290

⑤ Int.Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和63年(1988)1月19日

C 12 P 7/64  
// (C 12 P 7/64  
C 12 R 1:645)

7236-4B

審査請求 未請求 発明の数 1 (全8頁)

⑭ 発明の名称 アラキドン酸含有脂質の製造方法

⑮ 特 願 昭61-212168

⑯ 出 願 昭61(1986)9月9日

優先権主張 ⑰ 昭60(1985)10月1日 ⑱ 日本(JP) ⑲ 特願 昭60-218558

⑳ 昭61(1986)3月31日 ㉑ 日本(JP) ㉒ 特願 昭61-73450

㉓ 発 明 者 戸 谷 永 生 神奈川県小田原市中町3-1-12 コーポ明和102

㉔ 発 明 者 砂 崎 和 彦 神奈川県中郡二宮町富士見ヶ丘3-17-34号

㉕ 発 明 者 工 藤 俊 博 神奈川県秦野市南ヶ丘2-2-2-306号

㉖ 出 願 人 ライオン株式会社 東京都墨田区本所1丁目3番7号

㉗ 代 理 人 弁理士 中 村 稔 外5名

## 明 細 書

1. 発明の名称 アラキドン酸含有脂質の製造方法

2. 特許請求の範囲

モルティエセラ属のアルピナ、バイニエリ、エロンガタ、エクシグア、ミヌティッシマ、ヴァーティシラタ、ハイグロフィラまたはポリセファラ種のいずれかに属する菌株を培養することによりアラキドン酸を含む脂質を生産することを特徴とするアラキドン酸含有脂質の製造方法。

## 3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明はアラキドン酸含有脂質の製造方法に関し、更に詳細にはモルティエセラ属に属する特定の菌種を培養して、アラキドン酸含量の高い脂質を製造する方法に関する。

(従来の技術)

アラキドン酸は、子宮筋収縮・弛緩作用、血管拡張、血圧降下作用等、強力かつ多彩な生理活性を有するプロスタグランディン、トロンボキサン、プロスタサイクリン、ロイコトリエン等の前駆物質といわれ、近年特に注目されている。アラキドン酸は動物界に広く分布しており、従来、動物副腎腺や肝臓から抽出した脂質から分離されている。しかしこれらの脂質中のアラキドン酸含有量は一般に5%以下であり、乾燥細胞重量当りの収率は0.2%以下にすぎないこと、原材料の大量入手が困難であることなどから、この抽出法はアラキドン酸の有用な製造法とはいえない。

一方、アラキドン酸生産能を有する種々の微生

物を培養してアラキドン酸を得る方法が提案されている。たとえば特開昭52-64482号公報、同52-64483号公報、同52-64484号公報には、ベニシリウム属、クラドスポリウム属、ムコール属、フザリウム属、ホルモデンドラム属、アスペルギルス属、またはロードトルラ属に属するアラキドン酸生産能を有する微生物を炭化水素、炭水化物等を炭素源とする培地で培養し、培養物からアラキドン酸を採取する方法が記載されている。しかしこの方法により得られる脂質中のアラキドン酸含有量は7.5%以下であり、乾燥菌体当りの収率も1%に満たない。

また接合菌類はえかび目の糸状菌であるエントモフトラ属、デラクロイキシア属、コニディオボルス属、フィティウム属およびフィトフトラ属に属する菌にアラキドン酸を生産する菌があり、エントモフトラ属のE. エクシティアリスでは脂質中の全脂肪酸の27.1%、E. イグノビリスでは19.1%、E. サクステリアナでは18.8%をアラキドン酸が占めていると報告されている(D.

ティレル(D. Tyrrell)、カナディアン・ジャーナル・オブ・マイクロバイオロジー(Can. J. Microbiol.)、Vol. 13(1967)、755-760)。さらにモルティエセラ、レニスボラがアラキドン酸を生産すること、菌糸の脂質生産量は4.8%、脂質中のアラキドン酸含有量は26.7%であること(R. H. ハスキンス(Haskins)ら、Can. J. Microbiol., Vol. 10(1964)、187-195)、および、紅藻類ポルフィリディウム・クルエンタムがアラキドン酸を生産すること、その収率は、乾燥細胞重量当り1%以下であること(T. J. アヘルン(Ahern)ら、バイオテクノロジー・アンド・バイオエンジニアリング(Biotechnology and Bioengineering)、Vol. XXV、1057-1070(1983))も、報告されている。

〔発明が解決しようとする問題点〕

しかしこれら微生物の乾燥菌体重量当りのアラキドン酸含量、および得られる脂質中のアラキドン酸含量はいずれも十分に高いものとはいえな

かった。したがって本発明の目的は、乾燥菌体重量当りのアラキドン酸含量、およびこの菌体から抽出される脂質中のアラキドン酸含量が高く、アラキドン酸の分離精製が容易で、高純度のアラキドン酸を高収率で得ることができる方法を提供することである。

〔問題を解決するための手段〕

本発明者は、モルティエセラ属に属する菌種についてそのアラキドン酸生産能を研究したところ、特定の菌種の微生物がアラキドン酸含量の高い脂質を生産することを見出し本発明を完成するに至った。

本発明は、モルティエセラ(*Mortierella*)属のモルティエセラ・アルピナ(*Mortierella alpina*)、モルティエセラ・バイニエリ(*Mortierella bainieri*)、モルティエセラ・エロンガタ(*Mortierella elongata*)、モルティエセラ・エクシグア(*Mortierella exigua*)、モルティエセラ・ミヌティッシマ(*Mortierella minutissima*)、モルティエセラ・ヴァーティシ

ラタ(*Mortierella verticillata*)、モルティエセラ・ハイグロフィラ(*Mortierella hygrophila*)、またはモルティエセラ・ポリセファラ(*Mortierella polycephala*)種のいずれかに属する菌株を培養することによりアラキドン酸を含む脂質を生産することを特徴とするアラキドン酸含有脂質の製造方法である。

本発明に有利に使用される菌の具体例としては、モルティエセラ・アルピナ(*Mortierella alpina*) IF0 8568、ATCC 16266、ATCC 32221、ATCC 42430

モルティエセラ・バイニエリ(*Mortierella bainieri*) IF0 8569

モルティエセラ・エロンガタ(*Mortierella elongata*) IF0 8570

モルティエセラ・エクシグア(*Mortierella exigua*) IF0 8571

モルティエセラ・ミヌティッシマ(*Mortierella minutissima*) IF0 8573

モルティエセラ・ヴァーティシラタ(*Mortierella*

verticillata) IFO 8575

モルティエラ・ハイグロフィラ(Mortierella  
hygrophila) IFO 5941

モルティエラ・ポリセファラ(Mortierella  
polycephala) IFO 6335

等があげられる。これらの菌は大阪市の財団法人  
醸酵研究所(IFO)及び米国アメリカン・タイ  
プ・カルチャー・コレクション(American Type  
Culture Collection, ATCC)の菌株目録に記載さ  
れている糸状菌である。

上記の糸状菌の培養は固液の培地を用いて、静  
置培養、振盪培養、通気攪拌培養などにより行わ  
れる。好ましい培地としては、ジャガイモ、サト  
イモ、サツマイモ、キャッサバ、タロイモ、キク  
イモなどのイモ浸出液、麦芽エキス、ペプトン、  
酵母エキス、コーン・スティーブ・リカー、カザ  
ミノ酸などに炭水化物などを加えまたは加えずに  
調製した培地、とくに好ましくは、ジャガイモ浸  
出液と炭水化物の混合物あるいは麦芽エキスがあ  
げられる。

素、その他の栄養源を添加して用いることもでき  
る。

培養の初発 pH は、4.0~7.0 が適当であり、  
培養温度は、10~33℃で好ましくは、20~  
30℃で2~20日間培養される。

このような好気条件での培養により当該糸状菌  
は培養され、生産される脂質は、大方、菌体内に  
含まれるので培養物より菌体を分離し、機械的ま  
たは物理的に摩砕後、溶剤、超臨界二酸化炭素な  
どにより抽出し、アラキドン酸含有量の高い脂質  
を得る。

得られた脂質は常法の加水分解、エステル化、  
またはエステル交換後、アラキドン酸の含有率を  
評価できる。また、脂質中のアラキドン酸含量が  
高いために従来法に比較して飛躍的に容易かつ経  
済的に溶剤やクロマトグラフィー分画、尿素付加  
分離法等により目的のアラキドン酸あるいはアラ  
キドン酸エステルの精製を行うことができる。アラ  
キドン酸あるいはアラキドン酸エステルの収率  
は、乾燥菌体当り、最高28.7%であり、従来の

イモ浸出液を調製するには、約1cm角に切った  
イモを1ℓの水に300gから2000g、好ま  
しくは、400gから1000g加えて約20分  
煮沸後、布で濾し、蒸留水を用いて1ℓの浸出液  
を作る。炭水化物は0~20%好ましくは、2~  
10%、浸出液の滅菌前あるいは別途滅菌したも  
のを浸出液滅菌後に添加する。炭水化物としては  
例えばグルコース、フラクトース、サッカロース、  
糖蜜、木材糖化液、デンプン水解物などがあげら  
れる。微量添加成分として、2価の金属、例えば  
Ca<sup>++</sup>あるいはMg<sup>++</sup>があげられる。Ca<sup>++</sup>の添  
加量は0.02~2g/(ℓ又はkg培地)、好まし  
しくは、0.05~1g/(ℓ又はkg培地)がよく、  
Mg<sup>++</sup>の添加量は0.01~5g/(ℓ又はkg培地)、  
好ましくは、0.02~2g/(ℓ又はkg培地)が  
よい。

窒素源としてアンモニア、アンモニウム塩、グ  
ルタミン酸、アスパラギン酸、尿素などを適宜組  
合せ、これに必要に応じてカリウム、ナトリウム、  
鉄、亜鉛、銅、マンガンなどの無機塩と、微量要

約20~30倍の生産性を実現できることになる。  
(発明の効果)

本発明によれば、アラキドン酸含有量の高い脂  
質を得ることができ、従来法の約30倍の収率で  
アラキドン酸を生産することができる。このよう  
に脂質中のアラキドン酸含量が極めて高いので、  
アラキドン酸の精製を非常に容易かつ短時間に行  
うことができ、高純度のアラキドン酸を大量かつ  
安価に供給することができる。したがってこれを  
原料として、種々の薬理活性が利用かつ期待され  
ているプロスタグランディン、トロンボキサン、  
プロスタサイクリン、ロイコトリエン等を従来よ  
り安価に合成することができる。

(実施例)

以下実施例により本発明を更に具体的に説明す  
る。

#### 実施例1

200gのジャガイモからの浸出液とグルコー  
ス20gに蒸留水を加えて1000mlとした培  
養液をpH5.6に調整した。その200mlを

500 ml の坂口フラスコに入れた培地にモルティエラ・アルビナ (IFO 8568)、モルティエラ・エロンガタ (IFO 8570) を個別に白金耳量接種し、25℃で6日間振盪培養した。得られた菌体は直ちに6000 rpm で遠心分離して集菌し、濾紙でできるかぎり水分をとり除いたのち秤量した。ついでその一部は、乾燥重量を求めるために用い、また残りは、乳鉢内でクロロホルム/メタノール (2:1 V/V) と共にすりつぶし、引き続きクロロホルム/メタノール (2:1 V/V) で総脂質を抽出した。得られた脂質は、ナトリウムメトキサイドを用いてメチルエステル化後、その脂肪酸組成をクロマトグラフ分析してアラキドン酸の含有率を求めた。結果を表1に示す。

表 1

| 菌                        | 乾燥菌体重量 (g/ℓ) | 乾燥菌体重量当りのメチルエステル量 (%) | 総メチルエステル中のアラキドン酸含有率 (%) | 乾燥菌体重量当りのアラキドン酸含有率 (%) |
|--------------------------|--------------|-----------------------|-------------------------|------------------------|
| モルティエラ・アルビナ<br>IFO 8568  | 6.14         | 29.6                  | 36.9                    | 10.9                   |
| モルティエラ・エロンガタ<br>IFO 8570 | 8.02         | 39.4                  | 15.8                    | 6.2                    |

ハスキンスらは、前述のごとくモルティエラ・レニスボラから乾燥菌体重量当り4.8%の脂質を得、その脂質中のアラキドン酸含量が26.7%であったことを報告しているが、これを乾燥菌体重量当りのアラキドン酸含量に換算すると1.28% (= 26.7% × 4.8%) になる。これに対して本発明によると、それに対応する表1中の数値は、アルビナは10.9%、エロンガタは6.2%であり、それぞれハスキンス法の約8倍と5倍を示し、本発明の生産効率が優れていることがわかる。

#### 実施例 2

400 g のジャガイモからの浸出液にグルコース40 g と寒天40 g を加え蒸留水で2000 ml とした培養液 (pH 5.6) をオートクレーブにかけ直径80 mm の滅菌シャーレ100個に分注して寒天培地を調整した。50個ずつのシャーレにモルティエラ・アルビナ (IFO 8568) とモルティエラ・エロンガタ (IFO 8570) を個別に白金耳量接種し、25℃で10日間培養した。培養後、培地上の白綿状の菌糸をスパチュ

ラで集め、実施例1と同様の処理を行って表2の結果を得た。

上記の2株と同様にモルティエラ・アルビナ (ATCC 16266、ATCC 32221、ATCC 42430)、モルティエラ・バイニエリ (IFO 8569)、モルティエラ・エクシグア (IFO 8571)、モルティエラ・ミスティシマ (IFO 8573)、モルティエラ・ヴァーティシラタ (IFO 8575)、モルティエラ・ハイグロフィラ (IFO 5941)、モルティエラ・ポリセファラ (IFO 6335) についても培養を行い、その抽出脂質から得たメチルエステルの分析結果を表2にあわせて示す。

表 2

| 菌                            | 乾燥菌体重量当りの<br>メチルエステル量(%) | メチルエステル中のア<br>ラキドン酸含有率(%) | 乾燥菌体重量当りのアラキ<br>ドン酸メチル含有率 (%) | 生産効率 (対ハスキンス法)<br>生産効率 (対従来生産法) |
|------------------------------|--------------------------|---------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| モルティエセラ・アルビナ<br>IFO 8568     | 35.8                     | 80.2                      | 28.7                          | 22 倍<br>29 "                    |
| モルティエセラ・アルビナ<br>ATCC 16266   | 37.0                     | 64.8                      | 24.0                          | 19 "<br>24 "                    |
| モルティエセラ・アルビナ<br>ATCC 32221   | 34.7                     | 70.6                      | 24.5                          | 19 "<br>25 "                    |
| モルティエセラ・アルビナ<br>ATCC 42430   | 27.9                     | 80.1                      | 22.3                          | 17 "<br>22 "                    |
| モルティエセラ・バイニエリ<br>IFO 8569    | 38.6                     | 28.0                      | 10.8                          | 8 "<br>11 "                     |
| モルティエセラ・エロンガタ<br>IFO 8570    | 46.2                     | 35.7                      | 16.5                          | 13 "<br>17 "                    |
| モルティエセラ・エクシグア<br>IFO 8571    | 14.3                     | 37.6                      | 5.4                           | 4 "<br>5 "                      |
| モルティエセラ・ミスティッシマ<br>IFO 8573  | 33.6                     | 45.4                      | 15.3                          | 12 "<br>15 "                    |
| モルティエセラ・ヴァーティシラタ<br>IFO 8575 | 33.0                     | 42.3                      | 14.0                          | 11 "<br>14 "                    |
| モルティエセラ・ハイグロフィラ<br>IFO 5941  | 21.5                     | 30.3                      | 6.5                           | 5 "<br>7 "                      |
| モルティエセラ・ポリセファラ<br>IFO 6335   | 14.5                     | 47.2                      | 6.8                           | 5 "<br>7 "                      |

乾燥菌体重量当りのアラキドン酸メチルの含有率は、ハスキンス法(1.28%)と比較して特にアルビナは22倍、他の従来生産法と比較すると29倍となり、著しい生産効率の向上が期待できる。

### 実施例3

日水製薬社製麦芽寒天培地45gを蒸留水1000mlに加えオートクレーブで121℃15分間滅菌後、直径80mmの滅菌シャーレ50個に分注して寒天培地を調整した。10個ずつのシャーレにモルティエセラ・アルビナ(IFO 8568)、モルティエセラ・バイニエリ(IFO 8569)、モルティエセラ・エロンガタ(IFO 8570)、モルティエセラ・ミスティッシマ(IFO 8573)、モルティエセラ・ヴァーティシラタ(IFO 8575)、を個々に白金耳量接種し、25℃で10日間培養した。培養後、培地上の白色の菌体をスパチュラで集め、実施例1と同様の処理を行って表3の結果を得た。

上記の5株と同様にモルティエセラ・アルビナ

ATCC 16266、ATCC 32221、ATCC 42430についても培養を行い、その抽出脂質から得たメチルエステルの分析結果を表3にあわせて示す。

表 3

| 菌                            | 乾燥菌体重量当りの<br>メチルエステル量<br>(%) | メチルエステル中の<br>アラキドン酸含有率<br>(%) | 乾燥菌体重量当りの<br>アラキドン酸メチル<br>含有率 (%) |
|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|
| モルティエラ・アルビナ<br>IFO 8568      | 33.7                         | 78.8                          | 26.6                              |
| モルティエラ・アルビナ<br>ATCC 16266    | 32.4                         | 68.5                          | 22.2                              |
| モルティエラ・アルビナ<br>ATCC 32221    | 37.5                         | 70.3                          | 26.4                              |
| モルティエラ・アルビナ<br>ATCC 42430    | 36.5                         | 70.1                          | 25.6                              |
| モルティエラ・バイニエリ<br>IFO 8569     | 29.5                         | 26.4                          | 7.8                               |
| モルティエラ・エロガンタ<br>IFO 8570     | 24.8                         | 30.0                          | 7.4                               |
| モルティエラ・ミスディッ<br>シマ IFO 8573  | 15.4                         | 53.0                          | 8.2                               |
| モルティエラ・ヴァーティ<br>シラタ IFO 8575 | 14.0                         | 50.9                          | 7.1                               |

## 実施例 4

日水製薬社製サブロウ寒天培地 32.5 g を蒸留水 500 ml に加え、オートクレーブで 121℃、15 分間滅菌後、直径 80 mm の滅菌シャーレ 25 個に分注して寒天培地を調整した。この培地にモルティエラ・アルビナ ATCC 42430 を白金耳量接種し、25℃で10日間培養した。培養後、培地上の白色の菌糸をスパチュラで集め、実施例 1 と同様の処理を行って表 4 の結果を得た。

表 4

| 菌                         | 乾燥菌体重量当りの<br>メチルエステル量<br>(%) | メチルエステル中の<br>アラキドン酸含有率<br>(%) | 乾燥菌体重量当りの<br>アラキドン酸メチル<br>含有率 (%) |
|---------------------------|------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|
| モルティエラ・アルビナ<br>ATCC 42430 | 23.3                         | 65.1                          | 15.2                              |

## 実施例 5

ジャガイモ 100 g、300 g、500 g からの浸出液のそれぞれにグルコース 30 g と蒸留水を加え、各 500 ml とした培養液を L 字管に 250 ml ずつ分注滅菌後、モルティエラ・アルビナ (IFO 8568) を植菌し、25℃下、20 日間振盪培養した。得られた菌体は遠心分離により集菌洗浄後、乾燥し、乳鉢内でクロロホルム/メタノール (2:1 V/V) と共にすりつぶし、引き続きクロロホルム/メタノール (2:1 V/V) で総脂質を抽出した。得られた脂質は、ナトリウムメトキサイドを用いてメチルエステル化後、その脂肪酸組成をクロマトグラフ分析してアラキドン酸の含有率を求め、表 5 の結果を得た。

ジャガイモの使用量が多くなるにしたがってアラキドン酸の収率も向上することがわかる。



表 5

| 菌        | 培 地           | 乾燥菌体重量 (g/ℓ) | 乾燥菌体重量当りのアラキドン酸メチル含有率 (%) | 総メチルエステル中のアラキドン酸含有率 (%) | 乾燥菌体重量当りのアラキドン酸メチル含有率 (%) | 培地当りのアラキドン酸メチルの収率 (g/ℓ) |
|----------|---------------|--------------|---------------------------|-------------------------|---------------------------|-------------------------|
| IFO 8568 | ジャガイモ 200g/ℓ  | 6.48         | 36.5                      | 42.3                    | 15.4                      | 0.998                   |
|          | ジャガイモ 600g/ℓ  | 14.8         | 29.0                      | 39.7                    | 11.5                      | 1.70                    |
|          | ジャガイモ 1000g/ℓ | 18.0         | 30.9                      | 37.8                    | 11.7                      | 2.11                    |

表 6

| 培 地   | 乾燥菌体重量 (g/ℓ) | 乾燥菌体重量当りのアラキドン酸メチル含有率 (%) | 総メチルエステル中のアラキドン酸含有率 (%) | 乾燥菌体重量当りのアラキドン酸メチル含有率 (%) | 培地当りのアラキドン酸メチルの収率 (g/ℓ) | アラキドン酸メチルの収率増加率 (%) |
|---|--------------|---------------------------|-------------------------|---------------------------|-------------------------|---------------------|
| CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O 185mg/250mℓ | 16.8         | 27.7                      | 42.7                    | 11.8                      | 1.99                    | 17.1                |
| MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O 100mg/250mℓ | 18.2         | 26.9                      | 40.7                    | 10.9                      | 1.99                    | 17.1                |
| MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O 515mg/250mℓ | 13.7         | 36.3                      | 35.5                    | 12.9                      | 1.77                    | 4.1                 |
| なし  | 14.8         | 29.0                      | 39.7                    | 11.5                      | 1.70                    | 0                   |

## 実施例 6

ジャガイモ 600g からの浸出液にグルコース 60g を加え、蒸留水で 1ℓ とした培養液を 4 本の L 字管に 250mℓ ずつ分注滅菌した。同時に、CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 185mg、MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 100mg 及び 515mg をそれぞれ 1mℓ の水に溶かしたものも滅菌し、個々に 3 本の L 字管に加えた後、モルティエラ・アルビナ (IFO 8568) を植菌し、25℃ 下 20 日間振盪培養した。得られた菌体は遠心分離により集菌洗浄後、乾燥し、実施例 5 と同様の処理を行って表 6 の結果を得た。

Ca<sup>++</sup> と Mg<sup>++</sup> は明らかに培地当りのアラキドン酸メチルの収率を向上させるが、乾燥菌体重量当りのアラキドン酸メチルの含有率はほぼ一定であった。

アラキドン酸精取のため、モルティエラ・アルビナの総脂質をエステル化して得られたメチルエステル 50mg を逆相系薄層板 RP-18F (メルク社製) 上でメタノール/アセトニトリル (1:1 V/V) を用いて展開し、R<sub>f</sub> 値 0.41 のバンドをかきとって回収したところ、純度 95.9% (4.1% は γ-リノレン酸メチル) のアラキドン酸メチルが 35mg 得られた。

## &lt;アラキドン酸メチルの同定&gt;

本発明により得られたモルティエラ属の菌体より単離したアラキドン酸メチル (メチルエイコサー 5, 8, 11, 14-テトラエノエイト 分子量 318.5) は以下の 5 項目の分析により同定を行った。

i) 元素分析: 純度 95.9% のアラキドン酸メチル (4.1% は γ-リノレン酸メチル) の分析

結果は、炭素が79.34%、水素が11.21%であった。計算値はそれぞれ79.15%と10.77%であり、よい一致をみた。

ii) ガスクロマトグラフ分析: DEGS 15% (カラム温度190℃)、SE-30 (カラム温度170℃)、OV-101 (カラム温度170℃) の3種のカラムを用いて標準のアラキドン酸メチルの保持時間と比較したところ、非常によく一致した。

iii) ガス・マス分析: DEGS 10% (カラム温度200℃) を通過させ、該当するピークをイオン化電圧70 eVでイオン化して得たマスフラグメントパターンを標準のアラキドン酸メチルのマスフラグメントパターンと比較したところ、両者は酷似しており、親ピークは318に現れた。但し、 $m/e$  200以上のフラグメントシグナルは、 $m/e$  0-200の範囲の感度の5倍にして測定した。

iv) H-核磁気共鳴スペクトル分析: 標準のアラキドン酸メチルのスペクトルと酷似し、 $\delta$  値

3.6 ppm 付近のメチルエステルのプロトン強度を基準として計算すると二重結合核に直接結合するプロトン (5.0 ~ 5.7 ppm) は8個、二重結合には含まれたメチレンのプロトン (2.6 ~ 3.3 ppm) は6個存在することがわかり、メチルテトラエノエイトの構造を支持した。

v)  $C^{13}$ -核磁気共鳴スペクトル分析:  $\delta$  値 15 ~ 35 ppm のメチレンの炭素に由来するシグナル、50 ppm 付近のメチルエステルの炭素に由来するシグナル、130 ppm 付近の二重結合核を形成する炭素によるシグナルの各々のパターンが標準アラキドン酸メチルのそれと酷似し、当該物質がアラキドン酸メチルの二重結合に関する位置異性体でないことを確認した。

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成6年(1994)4月5日

【公開番号】特開昭63-12290

【公開日】昭和63年(1988)1月19日

【年通号数】公開特許公報63-123

【出願番号】特願昭61-212168

【国際特許分類第5版】

C12P 7/64 8114-4B

//(C12P 7/64

C12R 1:645 )

手 続 補 正 書

5. 6. 23  
平成 年 月 日

特許庁長官 麻 生 渡 殿

1. 事件の表示 昭和61年特許願第212168号

2. 発明の名称 アラキドン酸含有脂質の製造方法

3. 補正をする者

事件との関係 出 願 人

名 称 (876)ライオン株式会社

4. 代 理 人

住 所 東京都千代田区丸の内3丁目3番1号  
電話(代)3211-8741

氏 名 (5995)井理士 中 村



5. 補正命令の日付 自 発

6. 補正の対象 明細書の発明の詳細な説明の欄

7. 補正の内容

明細書第16頁下から3行目の“菌体”を「菌糸」  
に訂正する。